

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
9. Jg., S. 304—308, Juli 1971

## Reinigung und Eigenschaften der Hämagglutinine Anti-A<sub>CN</sub> und Anti-A<sub>CA</sub>

Von S. SCHNITZLER, W. KRÜGER, D. FELIX, H. DAVID, I. UERLINGS, M. BÖTTGER und W. KUHN

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin (Direktor: Prof. Dr. O. Prokop) der Humboldt-Universität zu Berlin, dem Forschungsinstitut Manfred von Ardenne (Leiter: Prof. Dr. h. c. M. v. Ardenne), der Abteilung für Elektronenmikroskopie der Charité (Leiter: Prof. Dr. H. David) am pathologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. L.-H. Kettler) der Humboldt-Universität zu Berlin und dem physiko-chemischen Zentrum (Leiter: Dr. habil. G. Etzold) der Institute für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften, Berlin-Buch

(Eingegangen am 11. Dezember 1970)

Die heterophilen Agglutinine Anti-A<sub>CN</sub> (aus der Schnecke *Cepaea nemoralis*) und Anti-A<sub>CA</sub> (aus der Schnecke *Caucasotachea atrolabiata*) wurden durch Adsorption an Sephadex G 100 gereinigt. Die Reinigung wurde durch immunoelektrophoretische Untersuchungen verfolgt. Die Agglutinine wandern im elektrischen Feld zur Kathode. Mit Celluloseacetatfolien konnte für Anti-A<sub>CA</sub> eine Heterogenität des reinen Agglutinins nachgewiesen werden. Es wird das Vorliegen von Aggregaten oder Polymeren angenommen. Durch 2-Mercapto-äthanol lassen sich die Agglutinine reversibel inaktivieren. Die Molekulargewichte werden mit 77000 für Anti-A<sub>CA</sub> und 73000 für Anti-A<sub>CN</sub> angegeben.

Elektronenmikroskopisch lassen sich ovoide bis längsovale Partikeln mit glatter Oberfläche zeigen, ihre Größe entspricht etwa dem Anti-A<sub>HP</sub>.

### *Purification and properties of the haemagglutinins anti-A<sub>CN</sub> and anti-A<sub>CA</sub>*

The heterophilic agglutinins anti-A<sub>CN</sub> (from the snail *Cepaea nemoralis*) and anti-A<sub>CA</sub> (from the snail *Caucasotachea atrolabiata*) were purified by adsorption on Sephadex G 100. The purification was checked by immunoelectrophoresis. The agglutinins migrate towards the cathode. Pure anti-A<sub>CA</sub> was found to be heterogeneous in electrophoresis on cellulose acetate. This heterogeneity is thought to be caused by the presence of aggregates or polymers. The agglutinins are reversibly inactivated by 2-mercaptoethanol. The determination of molecular weights gave 77000 for anti-A<sub>CA</sub> and 73000 for anti-A<sub>CN</sub>.

Electron microscopy reveals ovoid to elongated oval particles with flat surfaces, of about the same size as anti-A<sub>HP</sub>.

Unter der Bezeichnung Protectine werden in den Eiweißdrüsen verschiedener Schnecken und im Rogen von Fischen vorkommende heterophile antikörperähnliche Substanzen zusammengefaßt, die zur „immunchemischen“ Endgruppenbestimmung geeignet sind (1, 2). Die Reindarstellung gelang bisher bei Anti-A<sub>HP</sub> (Agglutinin aus der Schnecke *Helix pomatia* L.) (6, 7) und Anti-A<sub>OL</sub> (Agglutinin aus der Schnecke *Otala lactea*) (8). Weiter konnte gezeigt werden, daß die Schnecke *Cepaea hortensis* zwei Hämagglutinine verschiedener Spezifität enthält (3, 23).

OEHME und Mitarbeiter (3) trennten die Hämagglutinine aus *Cepaea hortensis* durch Gelfiltration über Sephadex. Mit Alkohol- und Ammoniumsulfat-Fällungen gelang VOGT und Mitarbeitern (4) eine deutliche Anreicherung von Anti-A<sub>HP</sub>. In Fortführung dieser Versuche kamen KNOBLOCH und Mitarbeiter (5) durch Säulenchromatographie mit Ionenaustauschern und nachfolgender Trypsin-Pronase-Behandlung zu einem reinen Produkt.

KÜHNEMUND und KÖHLER (6) eluierten reines Anti-A<sub>HP</sub> aus Sephadex-Säulen mit 0,5M Glucose-Lösung. HAMMARSTRÖM und KABAT (7) gewannen reines Anti-A<sub>HP</sub> durch spezifische Adsorption der wirksamen Komponente an unlösliche Polyleucyl-A-Substanz mit folgender Elution durch N-Acetyl-D-Galaktosamin. Über die Reinigung des Anti-A<sub>OL</sub> durch Alkohol-Fällung mit anschließender Säulenchromatographie über Biogel berichteten BHATIA und Mitarbeiter (8).

Reinigung und Eigenschaften weiterer Agglutinine, allerdings aus der Hämolymphe von Wirbellosen beschrieben MARCHALONIS und EDELMAN (9) sowie ACTON und Mitarbeiter (10).

Wäßrige Extrakte aus Eiweißdrüsenpulver verschiedener Schnecken enthalten ein Gemisch mehrerer Komponenten (11). Im folgenden soll die Isolierung der wirksamen Bestandteile aus den Eiweißdrüsen von *Cepaea nemoralis* (12) und *Caucasotachea atrolabiata* (13) beschrieben werden.

Beide Agglutinine unterscheiden sich in bezug auf ihren Rezeptor von Anti-A<sub>HP</sub> und untereinander und sind von Interesse für unsere Versuche an Tumorzellen (vgl. 14—16).

### Material und Methoden

#### *Ausgangsmaterial*

Die Exemplare von *C. nemoralis* wurden im Frühjahr 1970 bei Berlin gesammelt, die von *Caucasotachea atrolabiata* im August 1970 in der Umgebung von Suchumi (UdSSR). Nach Präparation der Eiweißdrüsen wurden diese nach PROKOP und Mitarbeitern (17) getrocknet und pulverisiert. Extrakte dieser Pulver in phosphatgepufferter NaCl-Lösung dienten als Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen.

#### *Agglutinationstest:*

In üblicher Weise auf Tüpfelplatten (18).

#### *Antiseren*

Die Antiseren wurden mit der für Anti-A<sub>HP</sub> beschriebenen Methode bei Kaninchen erzeugt (11). Ein Antiserum gegen

Rohextrakte aus der Eiweißdrüse von *Helix pomatia* zeigte mit *Caucasotachea*-Extrakten eine so starke Kreuzreaktion, daß sich die Herstellung eines speziellen Antiserums erübrigte.

#### Isolierung der Agglutinine

4–5 ml eines 10proz. Extraktes von Eiweißdrüsen in phosphatgepufferter NaCl-Lösung wurden auf eine Sephadex G 100-Säule (40 × 2 cm) aufgetragen, die mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung (pH = 7,2) äquilibriert war. Die Elution erfolgte bis zum Erscheinen der Elutionsfront mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung, anschließend mit einem Citronensäure-Phosphat-Puffer, pH = 3,4. Fraktionsgröße: 1,6 ml. Da die Agglutinine an Sephadex G 100 (auch G 150 und G 200) adsorbiert werden, lassen sich alle „unspezifischen“ Komponenten durch phosphatgepufferte NaCl-Lösung eluieren, während die Agglutinine erst durch den sauren Puffer zu gewinnen sind. K. FISCHER (pers. Mitt.) benutzt für Anti-A<sub>HP</sub> eine ähnliche Reinigungsmethode.

#### Immunoелеktrophorese

Mit Difco Special Noble Agar, Puffer nach HIRSCHFELD (19), auf 13 × 18 cm großen Glasplatten, um unter identischen Bedingungen mehrere Proben vergleichen zu können.

#### Membranfolielektrophorese

Auf Sartorius Membranfiltern (Sartorius GmbH, Göttingen), Veronalpuffer, pH = 8,6 nach Standardbedingungen (20), jedoch mit Laufzeiten von 4–5 Stdn.

#### Eiweißbestimmung

Nach FOLIN-LOWRY.

#### Mercaptoäthanol-Behandlung

Dialyse der Agglutinine in Anlehnung an UHLENBRUCK und Mitarbeiter (21) gegen 0,5M 2-Mercaptoäthanol (Fluka) in phosphatgepufferter NaCl-Lösung, pH = 7,2, 12 Stdn. bei 4°, nach Testung der Aktivität 12 Stdn. Dialyse gegen mehrfach gewechselte physiol. NaCl-Lösung.

#### Molekulargewichtsbestimmung

Apparente Molekulargewichte wurden mittels der klassischen Sedimentationsgleichgewichtsmethode bei kurzen Füllhöhen, siehe z. B. RICHARDS und Mitarbeiter (29), in einer analytischen Ultrazentrifuge Spinco E von Beckmann, die mit Monochromator und photoelektrischem Scanningsystem ausgerüstet ist, bestimmt. Es wurden jeweils Versuche bei zwei verschiedenen Konzentrationen ( $E_{1\text{cm}}^{280} = 0,4$  und  $0,6$ ) in phosphatgepufferter NaCl-Lösung durchgeführt. Eine detaillierte Messung der Konzentrationsabhängigkeit mußte wegen Mangel an Material unterbleiben. Die Tourenzahl und die Temperatur betrugen 12000 U/Min. und 20°. Gleichgewicht wurde nach etwa 10 Stdn. erreicht. Zur Auswertung wurde  $\log E$  gegen  $r^2$  aufgetragen ( $E$  stellt die Extinktion,  $r$  den Abstand vom Rotationszentrum dar); eine Grundlinienkorrektur wurde nach hochtourigem Abzentrifugieren vorgenommen. Da sich Geraden ergaben, ist mit der Anwesenheit von Aggregaten oder niedermolekularen Anteilen kaum zu rechnen.

Für den Auftriebsterm wurde vorläufig ein Wert von 0,25 der Berechnung zugrunde gelegt.

Der Fehler der Messungen ist nicht größer als  $\pm 5\%$ , wie sich anhand von Referenzmessungen an Ribonuclease A ergab.

#### Elektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Darstellung wurden die Lösungen der gereinigten Agglutinine analog zu l. c. (22) auf Kupferdrahtnetze oder Platinmehrlöcherblenden getropft, die mit einer kohlenstoffbedampften Zaponlackfolie versehen waren. Der Überstand wurde mit Filterpapier abgesaugt, danach folgte eine Spülung mit dest. Wasser. Zur Negativkontrastierung wurde 1proz. Phosphorwolframsäure bei pH = 6,0 benutzt.

Die Untersuchung erfolgte im Elmiskop 1a (Siemens) bei einer Strahlspannung von 80 kV und Vergrößerung 80000:1, Objektivaperturbende 50  $\mu\text{m}$ , Kondensoraperturbende 100  $\mu\text{m}$ , Objektraumkühlung, phototechnische Nachvergrößerung.

## Ergebnisse

Wie gegen Extrakte aus der Eiweißdrüse von *Helix pomatia* (11) bildeten die immunisierten Kaninchen auch gegen Extrakte aus *Cepaea-nemoralis*-Eiweißdrüsen und gereinigte Präparate gute präzipitierende Antiseren. Analog zu Anti-A<sub>HP</sub> liegt auch das gegen A-tragende Erythrocyten gerichtete Agglutinin Anti-A<sub>CN</sub> in kathodischer Position (Abb. 1), wie wir auch durch Absorptionsversuche mit A-Substanz zeigen konnten. Im Gegensatz zu Anti-A<sub>HP</sub>, bei dem sich das Agglutinin als nahezu symmetrischer Bogen darstellt, tritt bei Anti-A<sub>CN</sub> eine „Eindellung“ etwa in der Mitte des Bogens auf.

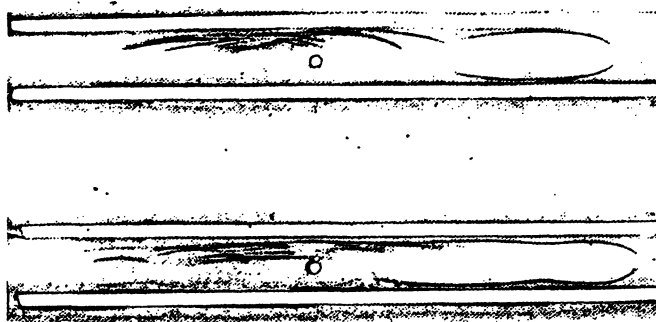


Abb. 1

Vergleichende immunoelektrophoretische Darstellung der Antiseren gegen Eiweißdrüsen-Rohextrakte von *Helix pomatia* (im oberen Kanal), gegen das gereinigte Anti-A<sub>HP</sub> (2. Kanal von oben), gegen Eiweißdrüsen-Rohextrakte von *Cepaea nemoralis* (2. Kanal von unten) und gegen gereinigtes Anti-A<sub>CN</sub> (unterer Kanal). Aufgetrennt: oben Eiweißdrüsen-Rohextrakt von *Helix pomatia*, unten von *Cepaea nemoralis*. Azokarminfärbung. Kathode rechts

Abbildung 2 zeigt das Elutionsdiagramm des *Cepaea-nemoralis*-Extraktes, Abbildung 3 die immunoelektrophoretischen Analysen ausgewählter Fraktionen. Während in den ersten Peaks die unwirksamen Proteine und das gegen N-Acetyl-Neuraminsäure gerichtete Agglutinin erscheinen, läßt sich das gegen A-Erythrocyten gerichtete Agglutinin (Rezeptoren:  $\alpha$ -N-Acetyl-D-Galaktosamin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -N-Acetyl-Glucosamin) erst durch den sauren Puffer eluieren und erscheint in immunoelektrophoretischer Form als letzter Peak.

Prinzipiell gleiches Verhalten zeigt auch der *Caucasotachea*-Eiweißdrüsenextrakt insofern, als nach Elution der unwirksamen Eiweiße das Agglutinin erst bei saurem pH zu eluieren ist. Auf eine immunoelektrophoretische Darstellung der bei pH = 7,2 zu gewinnenden Fraktionen wurde daher verzichtet. Abbildung 5 zeigt jedoch vergleichend Rohextrakt und reines Agglutinin.

Im Gegensatz zu *Cepaea*, deren Rohextrakt zwei Hämagglutinine enthält (3, 23), findet sich bei *Caucasotachea* die gesamte agglutinierende Aktivität im letzten Peak. Das reine Agglutinin Anti-A<sub>CA</sub> wandert auf Celluloseacetatfolien kathodisch und stellt sich in Form von mindestens 6 dicht zusammenliegenden, etwa gleichstarken Banden dar, ähnlich wie wir es auch bei Anti-A<sub>HP</sub> nachweisen konnten. Der Nachweis einer derartigen Heterogenität von Anti-A<sub>CN</sub> steht noch aus. Weitere Versuche sind eingeleitet.

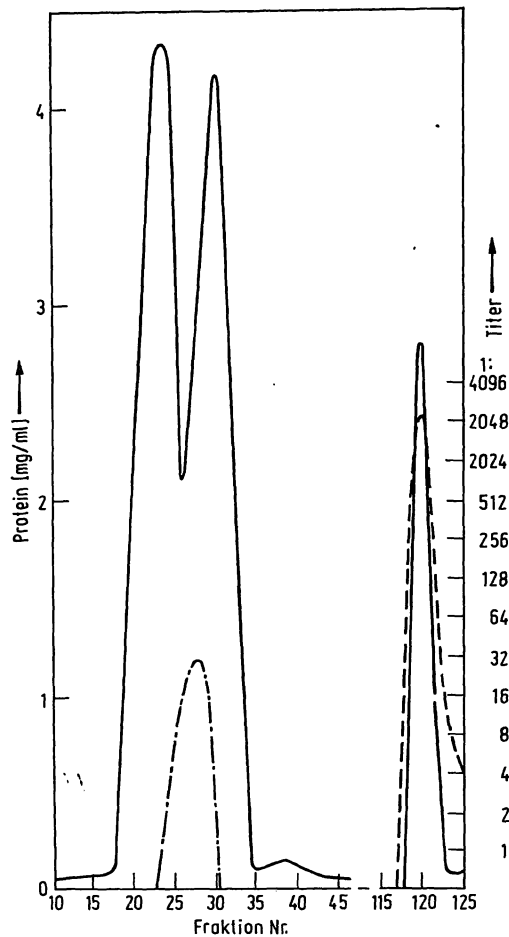


Abb. 2

Elution von *Cepaea-nemoralis*-Eiweißdrüsen-Rohextrakt über Sephadex G 100. Trennbedingungen s. Methoden. Vorliegen von 2 Hämagglutininen. Agglutinierende Aktivität gegen Erythrocyten unabhängig vom ABH-Muster (Anti- $M_{CN}^{duc}$ ) im 2. Peak, hier gegen O-Erythrocyten getestet. Aktivität gegen A-tragende Muster im letzten Peak

— Protein — Titer gegen  $A_1$  — · — Titer gegen O

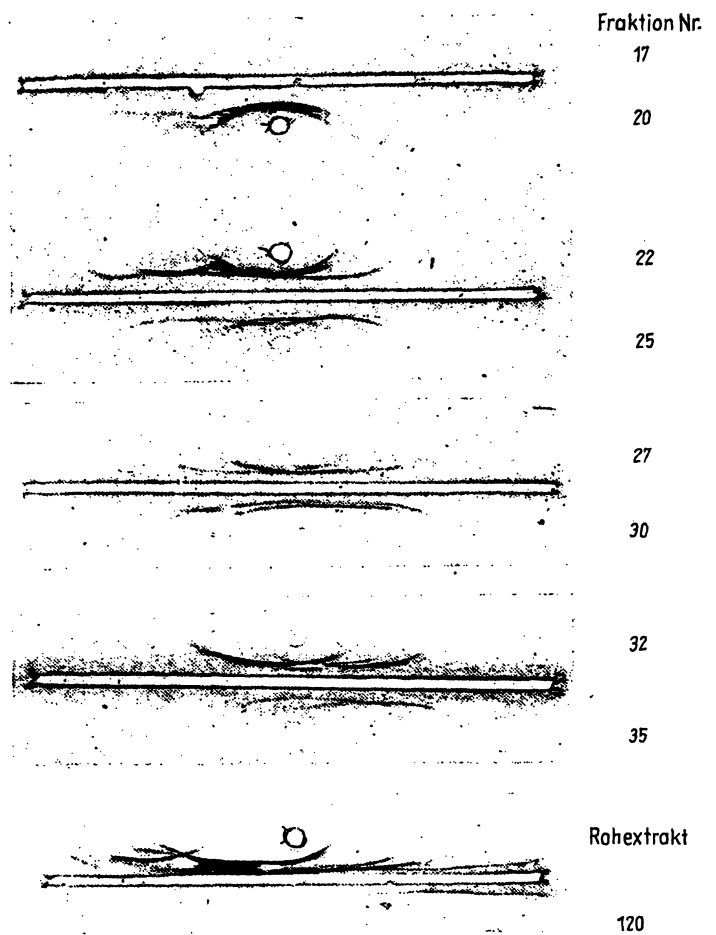


Abb. 3

Immunelektrophoretische Darstellung ausgewählter Fraktionen der *Cepaea-nemoralis*-Trennung (Abb. 2). Rechts Fraktionsnummer. Zum Vergleich Rohextrakt (2. Tupfel von unten). Im letzten Tupfel reines Agglutinin. Amidoschwarzfärbung. Kathode rechts

Durch 2-Mercaptoethanol ist die Aktivität von Anti- $A_{CN}$  und Anti- $A_{CA}$  aufzuheben (Titer vor Dialyse 1:256) nach Entfernung des 2-Mercaptoethanol beträgt der Titer wieder 1:128 bzw. 1:256.

Das Molekulargewicht beträgt nach den Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge für Anti- $A_{CN}$  73 000 und für Anti- $A_{CA}$  77 000. Eine Konzentrationsabhängigkeit scheint innerhalb der Fehlerbreite ( $\pm 5\%$ ) vernachlässigbar zu sein.

Die elektronenmikroskopisch dargestellten Moleküle sind ovoide bis längsovale Partikeln, die meist eine relativ glatte Oberfläche zeigen. Die Partikeln haben eine Tendenz, sich zusammenzulagern, z. T. zu kürzeren oder längeren Ketten, z. T. zu größeren Spontanaggregaten. Hierin sind sie den Agglutininen aus *Helix pomatia* ebenso vergleichbar wie in Form und Größe (22).

### Diskussion

Bei neutralem pH-Wert werden die gegen A-Erythrocyten gerichteten Agglutinine Anti- $A_{CA}$  und Anti- $A_{CN}$  an Sephadex G 100 bis G 200 adsorbiert. Wie bei Anti-

$A_{HP}$  kann als Ursache eine Anlagerung der Agglutininmoleküle an das Sephadex auf Grund der Nebenspezifität gegen N-Acetyl-D-Glucosamin angenommen werden.

Eine Elution ist durch Verdrängung mit Glucose oder durch Spaltung der adsorptiven Bindungen durch die  $H^+$ -Ionen des sauren Puffer möglich. Ein ähnliches Verfahren wurde von ASPBERG und PORATH für Phythämagglutinin-Glykoproteine angegeben (24).

Rohextrakte der hier näher untersuchten Schnecken-eiweißdrüsen agglutinieren scheinbar gleichartig alle menschlichen Erythrocytenmuster, A-tragende Zellen jedoch wesentlich stärker als nicht-A-geprägte. Bei *Cepaea nemoralis* ist das Vorkommen zweier Agglutinine mit verschiedener Chemospezifität bekannt (Anti- $M_{CN}^{duc}$ -Rezeptor: N-Acetyl-Neuraminsäure und Anti- $A_{CN}$ -Rezeptoren:  $\alpha$ -N-Acetyl-D-Galaktosamin und beide Anomere des N-Acetyl-D-Glucosamins (23, 25). Diese Agglutinine lassen sich durch Gelfiltration trennen, wie wir auch in der vorliegenden Arbeit bestätigen können. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei Anti- $A_{CA}$  ganz offensichtlich um ein Agglutinin mit einheitlicher Chemospezifität. Als Rezeptor sind hier wie bei Anti-

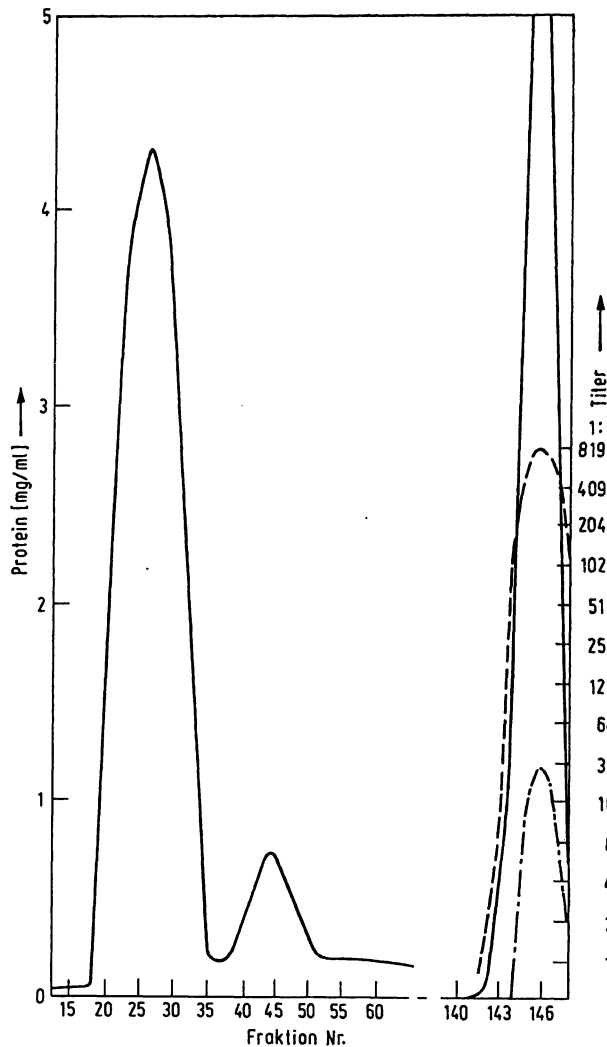


Abb. 4

Elution von *Caucasotachea-atrolabiata*-Eiweißdrüsen-Rohextrakt über Sephadex G 100. Trennbedingungen s. Methoden. Vorliegen nur eines Hämagglutinins

— Protein — — Titer gegen A<sub>1</sub> — · — Titer gegen 0

A<sub>HF</sub> jeweils beide Anomere des Galaktosamins und Glucosamins bekannt (25).  $\beta$ -N-Acetyl-D-Galaktosamin liegt auf den menschlichen Erythrocyten unabhängig vom ABH-Typ als Bestandteil des Globosid I vor (26). Dieser Rezeptor ist serologisch im Vergleich zu den durch  $\alpha$ -Galaktosamin determinierten A-Rezeptoren nicht leicht zugänglich. Deshalb können solche Rezeptoren nur mit hochkonzentrierten Anti-A<sub>CA</sub>-Extrakten erfaßt werden.

Mit der Elektrophorese auf Membranfolien konnte eine Heterogenität des reinen und immunoelektrophoretisch einheitlichen Agglutinins Anti-A<sub>CA</sub> nachgewiesen werden. Es könnte sich wie bei Anti-A<sub>HF</sub> um Aggregate (Quartärstrukturen) oder Polymere handeln.

Mittels der Ultrazentrifuge waren jedoch hierfür keine Hinweise zu erhalten. Sedimentationsgeschwindigkeitsmessungen, die unter Umständen größere Aggregate nachzuweisen gestatten, konnten bisher aus Materialmangel nicht durchgeführt werden.

Die Agglutininfraktion, die das Globosid I erfaßt, wurde von UHLENBRUCK (27) „superagglutinating Anti-A“

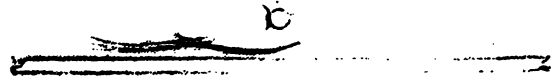


Abb. 5

Immunoelektrophoretische Analyse von *Caucasotachea*-Eiweißdrüsen-Rohextrakt (oben) und reinem Agglutinin (unten). Antiserum gegen *Helix-pomatia*-Eiweißdrüsen-Antigene. Amidoschwarzfärbung. Kathode rechts

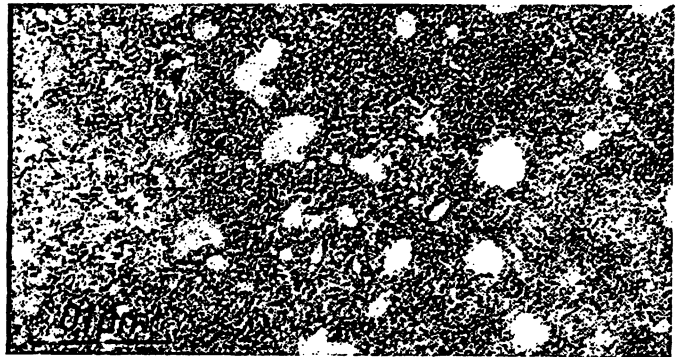
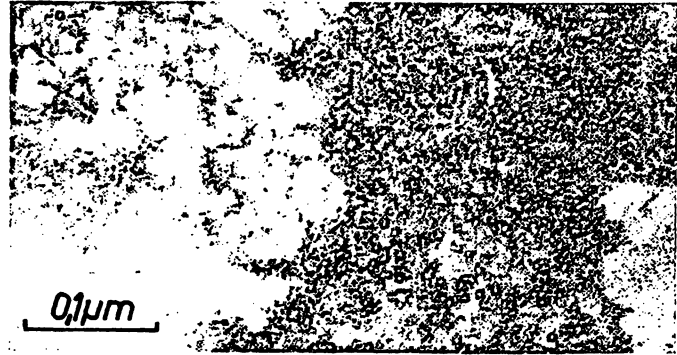


Abb. 6

Elektronenmikroskopische Darstellung von Anti-A<sub>1</sub> (oben) und Anti-A<sub>2</sub> (unten). Neben Einzelmolekülen und Molekülgruppen Spontanaggregate. Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure x 160000

genannt. Diese Aktivität ist in geringem Maße bei einigen hochkonzentrierten Anti-A<sub>HF</sub>-Präparaten nachweisbar (28), während sie bei Anti-A<sub>CA</sub> in höherem Tier vorliegt. Anti-A<sub>CN</sub> sollte eine derartige Aktivität nicht zeigen, da es  $\beta$ -Galaktosamin nicht erfaßt.

Die reversible Inaktivierung durch Mercaptoäthanol zeigt das Vorliegen von Disulfidbrücken und deren Bedeutung für die Agglutininwirkung. Sinngemäß gelten für Anti-A<sub>CA</sub> und Anti-A<sub>CN</sub> die Überlegungen zur Struktur, die von UHLENBRUCK und Mitarbeitern (21) für Anti-A<sub>HF</sub> angegeben wurden. Ohne zusätzliche proteinchemische Untersuchungen tragen jedoch weitere Aussagen zum Aufbau der Moleküle wie z. B. die räumliche Lage der Disulfidgruppen zueinander oder der Beitrag einzelner Disulfidgruppen für die Fixierung der wirksamen Struktur nur spekulativen Charakter. Die reversible Rückbildung der nativen Tertiärstruktur nach spontaner Reoxydation reduktiv gespaltenen Disulfidbrücken ist z. B. von der Ribonuclease bekannt. Form und Größe lassen sich jedoch aus der elektronenmikroskopischen Darstellung beurteilen. Auch hier sei

nur auf die große Ähnlichkeit zu Anti-A<sub>HP</sub> verwiesen (22). Die angegebenen Teilchengewichte von Anti-A<sub>CN</sub> und Anti-A<sub>CA</sub> sind denen anderer Hämagglutinine aus Schnecken vergleichbar. Dort aufgetretene größere Unterschiede haben möglicherweise ihre Ursache in den verschiedenen Präparationstechniken der einzelnen Bearbeiter. Beim Vergleich dieser Angaben weichen die Molekulargewichte des Agglutinins aus der Krabbe *Limulus polyphemus* (9) und der Auster *Crassostrea virginica* (10) stark von den zwischen 42 000 und 100 000

liegenden Molekulargewichten von Schneckenhämagglutininen ab.

Die Reindarstellung der beiden Protectine ist Voraussetzung für weitere Untersuchungen im Rahmen unserer Arbeiten mit Tumorzellen (14–16).

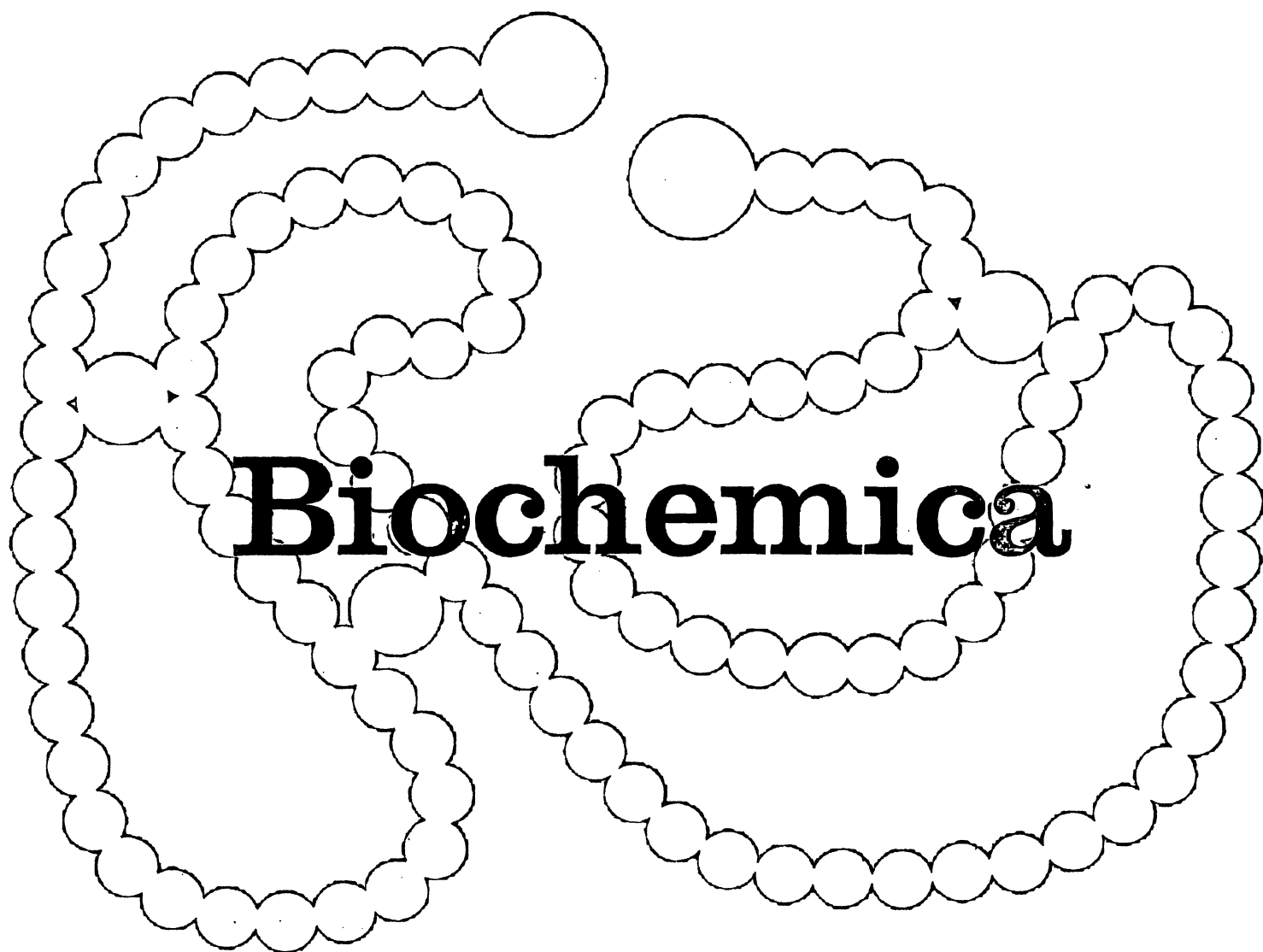
Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte im Auftrag und mit Unterstützung des Ministeriums für Gesundheitswesen der DDR im Rahmen des Komplexthemas „Krebs-Mehrschritt-Therapie“ (Thementräger: Forschungsinstitut Manfred von Ardenne, Dresden, Weißer Hirsch).

### Literatur

1. PROKOP, O., G. UHLENBRUCK und W. KÖHLER, Vox Sang. 14, 321 (1968). Dtsch. Gesdws. 23, 318 (1968). — 2. SCHNITZLER, S. und R. KILIAS, Blut 20, 221 (1970). — 3. OEHME, P., S. SCHNITZLER und W.-E. VOGT, Zschr. Immunit. Forsch. Stuttgart 136, 421 (1968). — 4. VOGT, W.-E., P. OEHME, W. KNOBLOCH und S. SCHNITZLER, Zschr. Immunit. Forsch., Stuttgart 138, 62 (1969). — 5. KNOBLOCH, W., I. KNOBLOCH, W.-E. VOGT, S. SCHNITZLER und W. BÖTTGER, Zschr. Immunit. Forsch., Stuttgart 139, 119 (1970). — 6. KÜHNEMUND, O. und W. KÖHLER, Experientia, Basel 25, 1137 (1969). — 7. HAMMARSTRÖM, St. und E. A. KABAT, Biochemistry, USA 8, 2696 (1969). — 8. BHATIA, H. M., Y. CHAKIM und W. C. BOYD, Vox Sang. 14, 170 (1968). — 9. MARCHALONIS, J. J. und G. M. EDELMANN, J. Mol. Biol. 32, 453 (1968). — 10. ACTON, R. T., J. C. BENNETT, E. E. EVANS und R. E. SCHROBENLOHER, J. biol. Chemistry 244, 4128 (1969). — 11. SCHNITZLER, S. und O. PROKOP, Zschr. Immunit. Forsch., Stuttgart 138, 41 (1969). — 12. PROKOP, O., A. RACKWITZ und D. SCHLESINGER, S. Afr. J. Forens. Med. 12, 108 (1965). — 13. SCHNITZLER, S., W. KRÜGER und G. UHLENBRUCK, Zschr. Immunit. Forsch., Stuttgart 140, 156 (1970). — 14. PROKOP, O., A. GRAEFFI und S. SCHNITZLER, Acta biol. med. german. 20, K 9 (1968). — 15. PROKOP, O., A. GRAFFI, F. HOFFMANN und S. SCHNITZLER, Dtsch. Gesdws. 23, 1926 (1968). — 16. ARDENNE, M. v., W. KRÜGER, O. PROKOP und S. SCHNITZLER, Dtsch. Gesdws. 24, 588 (1969). — 17. PROKOP, O., D. SCHLESINGER und A. RACKWITZ, Zschr. Immunit. Forsch., Stuttgart 129, 402 (1965). — 18. PROKOP, O. und G. UHLENBRUCK, Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen. 2. Aufl., VEB G. Thieme, Leipzig (1966). — 19. HIRSCHFELD, J., Science Tools 7, 18 (1960). — 20. Sartorius-Membranfilter-GmbH, Handbuch SM 10 (Ausg. 1969). — 21. UHLENBRUCK, G., Z. KIM und O. PROKOP, Nature, London 213, 76 (1967). — 22. SCHNITZLER, S., I. UERLINGS und H. DAVID, Acta biol. med. german. 26, 193 (1971). — 23. UHLENBRUCK, G., Blut 19, 487 (1969). — 24. ASPBERG, K. und J. PORATH, Acta chem. Scand. 24, 1839 (1970). — 25. UHLENBRUCK, G., W. GIELEN und G. I. PARDOE, Zschr. Krebsforsch. 74, 171 (1970). — 26. YAMAKAWA, T., S. NISHIMURA und M. KAMIMURA, Jap. J. Exper. Med. 35, 201 (1965). — 27. ISHIYAMA, I., G. UHLENBRUCK, U. REIFENBERG, S. SCHNITZLER und O. PROKOP, Z. Naturforsch. 26b, 171 (1971). — 28. SCHNITZLER, S., G. GESERICK, W. KRÜGER, S. D. GOGUCHIA, A. B. MIRVIS und H. A. ANNENKOW, Ärtzl. Lab. (im Druck). — 29. RICHARDS, E. G., D. C. TELLER und H. K. SCHACHMAN, Biochemistry, USA 7, 1054 (1968).

Für die Autoren:

Dr. Stephan Schnitzler  
Institut für gerichtliche Medizin  
der Humboldt-Universität  
X 104 Berlin, Hannoversche Str. 6



## **Polymer gebundene Enzyme**

**Bromelin · Chymotrypsin · Ficin · Papain · Pronase · Proteinase K  
(Tritirachium album) · Ribonuclease · Subtilisin · Trypsin (Rind) ·  
Trypsin (Schwein) · Trypsin-Inhibitor (Sojabohnen)**

### **Träger**

**Carboxymethylcellulose · Vernetztes Maleinsäureanhydrid**

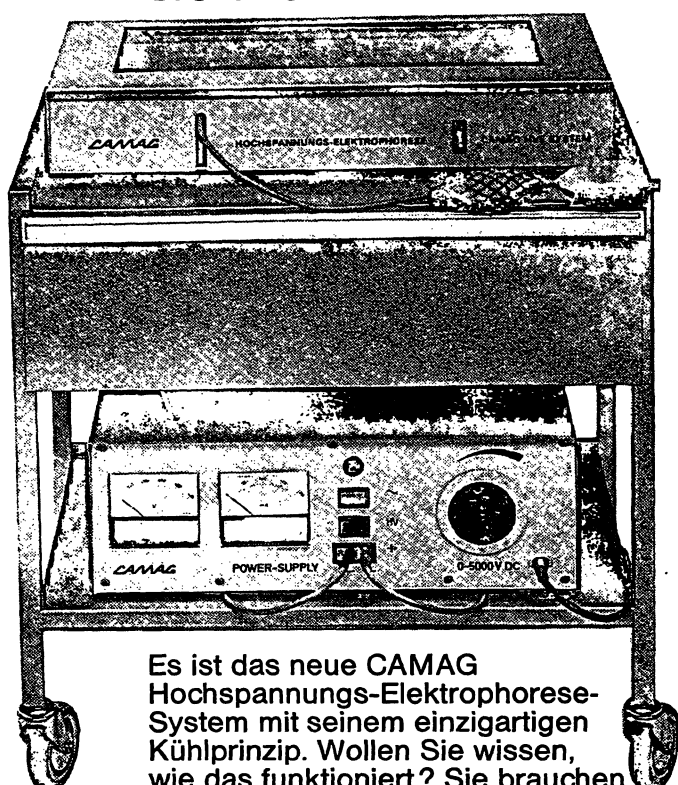
### **Besondere Vorteile**

**Hohe spezifische Aktivitäten · Enzymaktivität ausschließlich  
kovalent gebunden · Gleichbleibende Qualität durch  
Mindestaktivitätsangaben garantiert**

**Ausführliche Spezifikationen stehen auf Wunsch zur Verfügung.**

**E. Merck, Darmstadt**

# Aminosäure-Trennungen können Sie mit dieser Apparatur in 15 Minuten ausführen



Es ist das neue CAMAG Hochspannungs-Elektrophorese-System mit seinem einzigartigen Kühlprinzip. Wollen Sie wissen, wie das funktioniert? Sie brauchen dazu Leitungswasser und etwas Luft, beides haben Sie ja wohl im Hause. An das Wasser schliessen Sie die Zelle an, und mit der Luft ... aber das zeigen wir Ihnen am besten in Funktion, in Ihrem Hause.

Wenn Sie wollen, schicken wir Ihnen unseren Prospekt, aber lieber kommen wir zu Ihnen mit der ganzen Ausrüstung.

Natürlich können Sie auch andere niedermolekulare Substanzen trennen, z.B.: Indole, Porphyrine, Zucker, Purine, Vitamine, anorganische Ionen.

## CAMAG

Chemie-Erzeugnisse und Adsorptionstechnik AG  
Homburgerstrasse 24 4132 Muttenz/Schweiz

Unser Zweigbetrieb in der Bundesrepublik:  
CAMAG, 1000 Berlin 45, Baseler Strasse 65

HE-18

## Kantonsspital Schaffhausen (Schweiz)

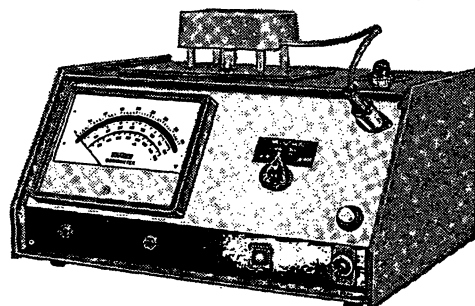
Die neu geschaffene Stelle eines vollamtlichen

## Leiters des medizinischen Zentral- laboratoriums

am Kantonsspital Schaffhausen ist sobald als möglich zu besetzen. Die Stellung des Laborleiters entspricht derjenigen der Chefärzte. Interessenten mit abgeschlossenem medizinischem und / oder chemischem Hochschulstudium sind eingeladen, sich bis zum 31. August 1971 schriftlich mit den nötigen Unterlagen bei der Kantonalen Sanitätsdirektion, Rathaus, CH-8201 Schaffhausen, zu bewerben. Für Auskünfte steht Dr. A. Uehlinger, medizinischer Chefarzt, Kantonsspital, Telefon 053. 8.12.22, zur Verfügung.

# KNAUER

## ELEKTRONISCHES HALBMIKRO-OSMOMETER



zur direkten Bestimmung der Osmolalität aller Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Urin, Liquor durch Gefrierpunkt-messung.

Kontrolle der Nierenfunktion

Kontrolle von iso-, hyper- und hypotonischen Lösungen  
Prüfung von Infusionslösungen

- Probenvolumen nur 0,15 ml oder 0,05 ml
- Betriebsbereitschaft sofort nach dem Einschalten
- Dauer einer Messung ca. 2 Minuten
- Meßgenauigkeit 1—2 Milliosmol/kg bzw. 1%
- Preis DM 3600,— + MWSt
- Lieferung ab Lager oder laufenden Serien

Weitere Spezialität: Komplettes System zur Molekulargewichtsbestimmung zwischen 100 und 1000000 durch Kryoskopie, Dampfdruck-Osmometrie und Membran-Osmometrie.

Wissenschaftlicher Gerätebau

KG Dr.-Ing. Herbert Knauer & Co. GmbH,

1 Berlin 37 (West), Holstweg 18, Tel. (0311) 84 87 05